

**Verfahren und Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen
Mikroorganismen oder von Blaualgen sowie Biosensor mit kultivierten
eukaryotischen Mikroorganismen oder Blaualgen**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen sowie einen Biosensor mit kultivierten eukaryotischen Mikroorganismen, bei denen es sich z. B. um Algen und insbesondere Mikroalgen handelt. Die Erfindung ist darüber hinaus auch anwendbar
5 bei Blaualgen.

Eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, werden im Gegensatz zu prokaryotischen Mikroorganismen relativ selten in großtechnischen Anlagen zur Gewinnung von Biomasse mit wertvollen Inhaltsstoffen eingesetzt.

10

Bekannte Verfahren zur Produktion von Algen sind die Kultur in offenen Becken, in tubulären oder plattenförmigen Photobioreaktoren. Nachteile dieser Verfahren sind hohe Kosten für die Gewinnung von Algentrockenmasse aus der Mediensuspension, ungünstige Lichtverhältnisse innerhalb der Kulturen, hohe
15 Kosten durch den zusätzlichen Einsatz von CO₂, das aufwändige Ernten der kultivierten Algen und mechanische Belastung der Organismen durch die Medienzirkulation sowie beim Ernten. Bisher ist kein wirtschaftliches Kulturverfahren zur großtechnischen Produktion von Mikroalgen bekannt.

20 Die in WO 97/11154 beschriebene Kultur von Immobilisierten Algen auf dünnen Schichten kann diese Probleme lösen. Hierzu werden Algen auf einem vertikal angeordneten Kunstfasergewebe immobilisiert. Durch einen laminaren Kulturmedienstrom wird der Gasaustausch zwischen Kultur und Umgebung erheblich beschleunigt, so dass keine zusätzliche CO₂-Gabe erforderlich ist.
25 Des weiteren ist die Lichtversorgung in dünnen Schichten effektiver. Die Biomasse kann mit vergleichsweise geringem Wassergehalt geerntet werden,

- 2 -

so dass der Trocknungsprozess wesentlich kostengünstiger ist. Durch die Immobilisierung wird der mechanische Stress herabgesetzt, was bei der Kultur von empfindlichen Algen von Bedeutung ist. Probleme bei diesem bisherigen Verfahren zeigen sich vor allem bei dem mechanisch stark beanspruchenden Ernteprozess, der einen verstärkten Verschleiß des Kunstfasersubstrats zur Folge hat, wobei dessen Wiederverwendbarkeit stark herabgesetzt wird. Weitere Nachteile sind das Abtragen eines Teils der Organismen von dem Substrat durch die über dieses strömende Nährlösung und die Kontamination durch Mikroorganismen im Kulturmedium. Letzteres könnte man durch ein steriles Kulturmediumversorgungssystem entschärfen, was allerdings aufwändig ist.

Die EP-A-0 239 272 beschreibt eine Anlage zur Herstellung von Biomasse, insbesondere Algenbiomasse. Die Anzucht erfolgt dort in einer transparenten Röhre, die um eine senkrecht stehende Kernstruktur gewickelt ist.

Aus US-A-2,761,813 und GR-B-1 003 266 ist es bekannt, einen Träger für das Aufwachsen von Mikroorganismen mit einer Nährlösung zu tränken, in die der Träger eingetaucht oder die auf den Träger appliziert wird. Beide Systeme erfordern einen Chargen-Betrieb, was der Effizienz der Mikroorganismen-Kultivierung Grenzen setzt.

In DHANANJAY PATANKAR ET AL: "WALL-GROWTH HOLLOW-FIBER REACTOR FOR TISSUE CULTURE: ÖII. A THEORETICAL MODEL" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. INCLUDING: SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN ENERGY PRODUCTION AND CONSERVATION, JOHN WILEY & SONS. NEW YORK, US, Bd. 36, Nr. 1, 5. Juni 1990 (1990-06-05), Seiten 104-108, XP000128553 ISSN: 0006-3592 ist ein Hohlfaserreaktor für Gewebekulturen beschrieben, bei dem eine Nährlösung durch Hohlfasern fließt und durch die Hohlfaserwand hindurch zur Außenseite gelangt, wo sich die Gewebezellen befinden. Das Abtragen dieser Zellen von der Außenseite ist auf Grund der Zylinderform der Hohlfasern aufwändig.

- 3 -

Ein System mit von einer Nährlösung durchströmbaren Rohren, an deren Membranwänden Mikroorganismen aufwachsen, ist in WO-A-90/02170 beschrieben.

- 5 In EP-A-0 112 155 ist eine dynamisch arbeitende Vorrichtung beschrieben, bei der durch jeweils zwei benachbarte und durch eine Membran getrennte Kanäle gegensinnig zwei Fluide strömen, von denen das eine Gewebezellen aufweist und das andere eine Nährlösung ist.
- 10 Ferner zeigt US-A-4,937,196 einen Membran-Bioreaktor, bei dem Zellkulturen zwischen benachbarten Membranen angeordnet sind, durch die Nährlösung einerseits und extra zelluläre Produkte sowie metabolische Reste andererseits diffundieren.
- 15 In US-A-6,013,511 ist ein System zur Extraktion von gelösten Metallen auf Abwässern beschrieben. Das Abwasser strömt an bzw. auf einer Membran mit immobilisierten Mikroorganismen entlang. Den Mikroorganismen wird von ihrer den Abwasserstrom abgewandten Seite aus eine Nährlösung zugeführt. Das Entfernen der Mikroorganismen ist mit nicht unerheblichem gerätetechnischen
- 20 Aufwand verbunden.

Schließlich zeigt US-A-4,600,694 eine Vorrichtung zum Ernten von Mikroorganismen durch Abschaben derselben von sich drehenden Scheiben.

- 25 Das der Erfindung zu Grunde liegende technische Problem ist die Verbesserung eines Kultivierungsverfahrens für eukaryotische Mikroorganismen sowie die Schaffung einer Vorrichtung, die ein verbessertes Verfahren zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen ermöglicht.
- 30 Dieses Problem wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und einer Vorrichtung gemäß Anspruch 8, die in einer Ausgestaltung als Biosensor gemäß Anspruch 12 eingesetzt werden kann.

- 4 -

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen weist die folgenden Schritte auf

- es wird ein perforierter Träger mit einer ersten Hauptfläche und einer zweiten Hauptfläche bereitgestellt, wobei der Träger ein Bahnmaterial aufweist und für eukaryotische Mikroorganismen im wesentlichen undurchlässig ist;
- auf die erste Hauptfläche werden Mikroorganismen appliziert und verbleiben dort ablösbar immobilisiert;
- entlang der zweiten Hauptfläche strömt eine wässrige Lösung;
- 10 - ein Teil der strömenden wässrigen Lösung tritt im wesentlichen auf Grund von Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche durch den Träger hindurch bis an die erste Hauptfläche des perforierten Trägers;
- wodurch die erste Hauptfläche des perforierten Trägers mit wässriger Lösung versorgt wird;
- 15 - die applizierten Mikroorganismen wachsen auf der ersten Hauptfläche.

Das die Erfindung darstellende neue Kultursystem für insbesondere Mikroalgen oder andere eukaryotische Mikroorganismen oder für Blaualgen basiert auf der funktionalen und konstruktiven Aufteilung einer zumindest zweilagig aufgebauten Schichtenfolge in eine Trägerschicht, auf der sich die Algenkulturen befinden, und eine Versorgungsschicht, die der Zufuhr von Kulturmedium durch die Trägerschicht hindurch dient.

Hierbei befindet sich die Versorgungsschicht als eine wässrige Lösung aufweisender an der Trägerschicht entlangströmender Flüssigkeitsfilm auf der einen Hauptfläche der Trägerschicht, während sich die zu kultivierenden Mikroorganismen auf der anderen Hauptfläche der Trägerschicht befinden. Die Trägerschicht (nachfolgend auch Träger genannt) besteht aus Bahnmaterial, ist also blattförmig. Es ist möglich, dass die Trägerschicht feststeht und die wässrige Lösung an ihrer einen Hauptfläche entlangströmt oder dass die Trägerschicht an der wässrigen Lösung entlangbewegt wird.

- 5 -

Ein Vorteil der räumlichen Trennung des Flüssigkeitsfilms von den zu kultivierenden Algen besteht unter anderem darin, dass nunmehr (kleine) Algen nicht mehr durch die Flüssigkeit von der Trägerschicht weggespült werden können. Die perforierte Trägerschicht fungiert ferner wie ein Filter, der zwar Flüssigkeit zu den Algen hindurchlässt, Mikroorganismen auf Grund der kleinstformatigen Perforation aber daran hindert, durch die Trägerschicht von deren einen Hauptfläche zu deren anderen Hauptfläche zu gelangen. Dadurch ist auch das Kontaminationsrisiko herabgesetzt. Schließlich lassen sich die kultivierten Mikroorganismen auf einfache Weise ernten, indem sie sich von derjenigen Hauptfläche der Trägerschicht, auf der sie kultiviert werden, abtragen lassen, ohne in den Systemaufbau eingreifen zu müssen. Allenfalls ist für die Dauer der Ernte die Zufuhr der wässrigen Lösung zu unterbrechen.

Die Versorgung der zweiten Hauptfläche mit der wässrigen Lösung, bei der es sich vorzugsweise um eine Nährstofflösung zur Kultivierung der eukaryotischen Mikroorganismen handelt, kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, so ist es z. B. möglich, dass die Trägerschicht vertikal herabhängend angeordnet wird und die eine Hauptfläche am oberen Ende der Trägerschicht mit der wässrigen Lösung versorgt wird, die auf Grund von Schwerkraft an dieser Hauptfläche der Trägerschicht nach unten strömt.

Alternativ ist es möglich, die Trägerschicht, wie bei Oberflächenbeschichtungssystemen für technische Anwendungen an sich bekannt (z. B. Folienbeschichtungsverfahren für z. B. Magnetbänder), über ein offenes Bad oder Becken zu bewegen, wobei lediglich die mit der wässrigen Lösung zu benetzende Hauptfläche der Trägerschicht in Kontakt mit der wässrigen Lösung gelangt; die dem Bad abgewandte mit Mikroorganismen versehene Seite der Trägerschicht kommt nicht in direkten Kontakt mit dem Bad.

Ein weiterer technischer Follenbeschichtungsprozess, der ebenfalls Anwendung im Zusammenhang mit der Erfindung finden kann, besteht darin, dass die wässrige Lösung über eine Schlitzdüse oder mehrere Einzeldüsen aus der Oberseite einer schiefen Ebene austritt, auf der sie dann bis zum am tiefsten

- 6 -

gelegenen Rand fließt, um dort mit der einen Hauptfläche der an dem Rand der schiefen Ebene entlang bewegten Trägerschicht in Kontakt zu gelangen und von dieser "mitgenommen" zu werden. Hierbei können auch mehrlagig aufgebaute laminar strömende wässrige Lösungen eingesetzt werden und über
5 der schiefen Ebene zur Trägerschicht gelangen.

Schließlich ist es auch möglich, die wässrige Lösung in Form eines "Flüssigkeitsvorhangs" auf die betreffende Hauptfläche der Trägerschicht auf-
treffen zu lassen.

10

Vorzugsweise ist die wässrige Lösung eine Nährlösung für Mikroorganismen.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der perforierte Träger auf einer Verteilerschicht angeordnet, die nach
15 zumindest teilweiser Benetzung bzw. Versorgung mit der wässrigen Lösung diese sowohl in ihrer Dicken- als auch Breiten- und Längenrichtung verteilt und damit auch über die Trägerschicht verteilt. Es kann insbesondere auf der Verteilerschicht ein perforierter weiterer Träger angeordnet sein.

20 Der im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte perforierte, bahn- bzw. blattförmige Träger, der perforierte weitere Träger und/oder die Verteilerschicht sind insbesondere hydrophil.

Bei Vertikalausrichtung der Träger-, Verteiler und Versorgerschicht kann die
25 Verteilerschicht zur abnehmbaren Halterung der Trägerschicht dienen, die an der Verteilerschicht in Folge der Adhäsion des Flüssigkeitsfilms haftet.

Durch die Verwendung dieses Materials wird die Ernte bei gleichzeitig sehr geringer Beanspruchung des Materials erheblich vereinfacht und kostengünsti-
30 ger. Die Verwendung einer nur für das Kulturmedium durchlässigen Trägerschicht in einem zweischichtigen System verhindert den Übergang der eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen in den Kulturmedienstrom. Dadurch wird zum einen die Auswaschung der Organismen verhindert,

- 7 -

wodurch eine erhöhte Biomasseproduktivität resultiert. Zum anderen entfallen kostenverursachende Aufreinigungsschritte des Kulturmediums. Bei der Verwendung einer für Mikroorganismen undurchlässigen Substratschicht können außerdem Kontaminationsrisiken für die Algenkulturen verringert werden.

Der perforierte Träger, der perforierte weitere Träger und/oder die Verteilerschicht besteht insbesondere aus organischen oder anorganischen Materialien.

10 Der perforierte Träger, der perforierte weitere Träger und/oder die Verteilerschicht kann dabei insbesondere aus mineralischen Fasern, hydrophilen organischen Fasern oder Kombinationen davon aufgebaut sein.

15 Als organisches Material kommt beispielsweise Papier, Celluloseester, insbesondere Celluloseacetat, Cellulosemischester, Cellulose, Cellulosenitrat, Polyamide, Polyester, und/oder Polyolefine in Betracht.

Als anorganisches Material kommt zum Beispiel eine poröse Keramik und/oder Glasfasern in Betracht.

20

Erfindungsgemäß können nach der Kultivierung die Mikroorganismen vom perforierten Träger und/oder vom perforierten weiteren Träger durch Einwirkung mechanischer Kräfte wie Abschaben oder chemischer Behandlung wie Behandlung mit oberflächenaktiven Agenzien und/oder organischen Lösungsmitteln abgelöst werden.

25

In einer anderen Ausführungsform können die Mikroorganismen zusammen mit dem perforierten Träger geerntet werden. Dies kann sinnvoll sein, wenn die Mikroorganismen am Träger verbleibend aufgeschlossen werden, um
30 Inhaltsstoffe beispielsweise durch Extraktion zu gewinnen. Die extrahierten Mikroorganismen oder Zelltrümmer können mit dem Träger mechanisch vom Extrakt getrennt werden.

- 8 -

In einer weiteren Ausführungsform können die Mikroorganismen durch Auffangen abgelöster Biomasse in fließendem Kulturmedium erhalten werden.

Die Mikroorganismen können insbesondere nach Trocknung vom porösen
5 Träger abgelöst und danach aufgefangen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere für Algen und Mikroalgen. Die Erfindung findet jedoch auch Anwendung bei der Kultivierung von Blaualgen.

10

Von der Vorrichtungsseite her kann die Erfindung in dem Doppelschichtaufbau aus Träger und einem daran angeordneten Film aus einer wässrigen Lösung gesehen werden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, ist also versehen mit:

- 15 - einem perforierten Träger, der eine erste Hauptfläche und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche aufweist,
- wobei die eukaryotischen Mikroorganismen auf der ersten Hauptfläche des perforierten Trägers kultivierbar sind und der perforierte Träger für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen im wesentlichen
20 undurchlässig ist, und
- einem eine wässrige Lösung aufweisenden Film, der in Kontakt mit lediglich der zweiten Hauptfläche des Trägers steht und entlang dieser strömt,
- wobei die wässrige Lösung auf Grund von Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche durch den perforierten Träger hindurch zur ersten
25 Hauptfläche transportierbar ist.

In Ergänzung eines zweischichtigen Aufbaus ist es auch möglich, einen dreischichtigen Aufbau zu wählen. Dieser Aufbau ist durch zwei Trägerschichten charakterisiert, zwischen denen der Flüssigkeitsfilm unter
30 Kontakt mit den einander zugewandten Hauptflächen der Träger angeordnet ist.

- 9 -

Damit sich die wässrige Lösung gleichmäßig über die zweite Hauptfläche der Trägerschicht verteilt, ist bei einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung eine (Flüssigkeits-)Verteilerschicht vorgesehen, die dem Film aus wässriger Lösung ausgesetzt ist und insbesondere durch diesen "getränkt" wird. Bei der Verteilerschicht handelt es sich vorzugsweise um eine Kapillarkräfte quer zur Dickenerstreckung der Trägerschicht erzeugenden Schicht, die insbesondere als Vlies aus vorzugsweise Kunststofffasern (z. B. sogenanntes Geotextil) ausgebildet sein kann. Die zweite Hauptfläche der Trägerschicht bzw. jede Trägerschicht steht in Kontakt mit der Verteilerschicht.

10

Im übrigen lässt sich die erfindungsgemäße Vorrichtung mit den Merkmalen der zuvor beschriebenen Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens kombinieren.

15 Neben der Verwendung als Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen lässt sich der erfindungsgemäße Zwei- bzw. Dreilagenaufbau aber auch als Biosensor mit eukaryotischen Mikroorganismen einsetzen. Dieser Biosensor ist erfindungsgemäß versehen mit:

- 20 - einem perforierten Träger, der eine erste Hauptfläche und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche aufweist,
- wobei die eukaryotischen Mikroorganismen auf der ersten Hauptfläche des perforierten Trägers immobilisiert kultivierbar sind und der perforierte Träger für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen im wesentlichen undurchlässig ist, und
- 25 - einem eine wässrige Lösung aufweisenden Film, der in Kontakt mit lediglich der zweiten Hauptfläche des Trägers steht und über diese strömt,
- wobei die wässrige Lösung auf Grund von Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche durch den perforierten Träger hindurch zur ersten Hauptfläche transportierbar ist,
- 30 - wobei die Kultivierung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der wässrigen Lösung und/oder eines in Kontakt mit der ersten Hauptfläche des perforierten Trägers stehenden Gases erfolgt.

- 10 -

Die auf einer der beiden Hauptflächen des Trägers kultivierbaren Mikroorganismen sind der Umgebung ausgesetzt. Ein Wachstum bzw. eine Degradation erfolgt in Folge der Zusammensetzung der wässrigen Lösung und/oder des in Kontakt mit den Mikroorganismen tretenden Gases. Auf diese Weise ist es
5 beispielsweise möglich, die wässrige Lösung oder, allgemein ausgedrückt, einen wässrigen Lösungsstrom auf bestimmte Inhaltsstoffe hin zu untersuchen. Beispielsweise könnte man anhand des Wachstums bestimmter Mikroorganismen auf dem Träger feststellen, dass die auf der Rückseite entlangströmende wässrige Lösung bestimmte Inhaltsstoffe aufweist. Genauso ist es aber
10 auch möglich, diese Detektion für das in Kontakt mit den Mikroorganismen stehende Umgebungsgas durchzuführen.

Der erfindungsgemäße Biosensor kann in einzelnen Ausgestaltungen die gleichen Merkmale wie die erfindungsgemäße Vorrichtung aufweisen. Insofern
15 sind vorteilhafte Weiterbildungen sowohl der erfindungsgemäßen Vorrichtung als auch des erfindungsgemäßen Biosensors Gegenstand der einzelnen Unteransprüche der Anspruchsfassung.

Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Zeichnung näher
20 erläutert. Im einzelnen zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Kultivierungsverfahrens für Algen auf Verbundschichten mit selektiver Permeabilität,

25 Fig. 2 eine vergrößerte Teildarstellung der Verbundschichtanordnung gemäß Fig. 1,

Fig. 3 die Anordnung der Verbundschichten zur Verwendung als Biosensor für Gase und

30

Fig. 4 die Anordnung der Verbundschichten als Verwendung des Biosensors für Flüssigkeiten.

- 11 -

Fig. 1 zeigt den grundsätzlichen Aufbau der erfindungsgemäßen Vorrichtung 10 zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen und Mikroalgen. Anhand dieser Figur und der vergrößerten Teildarstellung in Fig. 2 wird auch das erfindungsgemäße Verfahren deutlich.

5

Ein in diesem Ausführungsbeispiel vertikal angeordnetes Verbundschichtensystem 12 weist zwei Trägerschichten 14,16 auf, zwischen denen eine wässrige Lösung 18 entlang strömt. Die beiden Trägerschichten 14 sind parallel zueinander angeordnet und weisen an ihren einander abgewandten außenliegenden ersten Hauptflächen 19 eukaryotische Mikroorganismen 20 auf. Die Strömung aus wässriger Lösung 18 (nachfolgend auch Flüssigkeitsfilm genannt) steht in Kontakt mit den einander zugewandten innenliegenden zweiten Hauptflächen 22 der beiden Trägerschichten 14. Mit Hilfe der wässrigen Lösung wird eine in Dicken- und Breitenrichtung anisotrop von der Lösung durchströmbare Verteilerschicht 23 versorgt, die ebenfalls zwischen den beiden Trägerschichten 14 und 16 angeordnet ist. Diese Verteilerschicht 23 ist in diesem Ausführungsbeispiel als Vlies aus Kunststofffasern ausgebildet. Sie sorgt für die Verteilung der wässrigen Lösung über die zweiten Hauptflächen 22 der Trägerschichten 14,16.

20

Die Versorgung des Verbundschichtensystems 12 mit wässriger Lösung erfolgt über eine Zuführleitung 24, über die mittels einer Pumpe 26 aus einem Reservoir 28 wässrige Lösung gepumpt wird. Der aus dem Verbundschichtensystem 12 abfließende Teil der wässrigen Lösung 18 gelangt über eine Ablaufleitung 30 zum Reservoir 28, so dass insgesamt eine Zirkulation der wässrigen Lösung gegeben ist. Dies ist jedoch für die Erfindung nicht zwingend erforderlich. Anstelle von Zu- und Ableitungssystemen können auch andere Leitungssysteme verwendet werden.

30

Die beiden Trägerschichten 14 sind als Membranfilter aus beispielsweise Cellulosemischester ausgebildet, die demzufolge perforiert sind. Auf Grund dieser Perforation ist es möglich, dass die wässrige Lösung 18 auf Grund von Kapillarkraftwirkungen von der zweiten Hauptfläche 22 durch die Träger-

- 12 -

schichten 14 auf deren erste Hauptflächen 19 gelangt, wo sie zur Versorgung der Mikroorganismen 20 dient. Bei der wässrigen Lösung 18 handelt es sich also um eine Nährlösung für die Mikroorganismen 20.

- 5 Auf Grund der Filterwirkung der Trägerschichten 14 gelangen nun keinerlei zu kultivierende Mikroorganismen in die Nährmittellösung (wässrige Lösung 18). Sämtliche zu kultivierende Mikroorganismen verbleiben also auf der ersten Hauptfläche 19 einer Trägerschicht 14.
- 10 Darüber hinaus fungiert die Trägerschicht 14 aber auch als Trennung zwischen dem Nährmittelfluss und dem Ort der Kultivierung der Mikroorganismen. Dies hat den Vorteil, dass über die Nährmittelströmung keinerlei Mikroorganismen "mitgerissen" werden können.
- 15 Durch die zuvor beschriebene Filterwirkung wird überdies verhindert, dass die Mikroorganismen 20 über die Nährmittellösung bzw. deren Strömung kontaminiert werden. So ist beispielsweise hierdurch die Gefahr der Entstehung und Ausbreitung von Pilzen bzw. Amöben oder anderen Kontaminationsorganismen deutlich herabgesetzt, die zur völligen Zerstörung der zu kultivierenden Mikro-
- 20 organismen 20 führen kann.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren wurden anhand der Fig. 1 und 2 vorstehend für den Fall beschrieben, dass über einen Flüssigkeitsfilm (wässrige Lösung 18) direkt zwei einander gegen-

25 überliegende und Mikroorganismen aufweisende perforierte Trägerschichten "versorgt" werden. Es ist aber auch denkbar, dass der Flüssigkeitsfilm lediglich an der Rückseite eines Trägers entlang strömt, dessen Vorderseite die zu kultivierenden Mikroorganismen aufweist.

- 30 In den Fig. 3 und 4 sind zwei alternative Anordnungen zur Verwendung der Vorrichtung gemäß Fig. 1 und 2 (in Zweischichtaufbau) als Biosensor dargestellt. Gemäß Fig. 3 ist die Vorrichtung 10 in einem Messraum 32 angeordnet, dem die mit Mikroorganismen 20 versehene erste Hauptfläche 19 des

- 13 -

Verbundschichtensystems 12 ausgesetzt ist. Die Versorgung des Verbundschichtensystems 12 mit wässriger Lösung 18 (Nährmittellösung) erfolgt so, wie am Beispiel der Fig. 1 erläutert.

- 5 Je nach Zusammensetzung des Fluids, das in dem Messraum 32 angeordnet ist (Gas oder Flüssigkeit) verändert sich das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen 20. Indem unterschiedliche Mikroorganismen oder auch gleiche Mikroorganismen auf der Hauptfläche 19 der Trägerschicht 14 angeordnet sind, lässt sich anhand von deren Wachstumsverhalten auf die Zusammensetzung des Fluids schließen.
- 10

- Fig. 4 schließlich zeigt den Fall, dass mittels des Verbundschichtensystems 12 die Zusammensetzung der wässrigen Lösung 18 sensiert werden kann. Beispielsweise kann auf diese Weise eine zu messende Strömung 34 einer Flüssigkeit sensiert werden. Von dieser Flüssigkeit 34 wird die als wässrige Lösung 18 auf der Rückseite (Hauptfläche 22) der Trägerschicht 14 entlang strömende wässrige Lösung 18 abgezweigt und stromab wieder zugeführt. Anhand des Wachstums der Mikroorganismen 20 kann dann wiederum auf die Zusammensetzung der zu untersuchenden Flüssigkeit 34 geschlossen werden.
- 15
- 20 Hierbei ist es ebenfalls möglich, dass unterschiedliche Mikroorganismen auf der Trägerschicht 14 angeordnet sind.

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, Mikroalgen, oder von Blaualgen, wobei
 - ein perforierter Träger (14) mit einer ersten Hauptfläche (19) und einer zweiten Hauptfläche (22) bereitgestellt wird, wobei der Träger (14) ein Bahnmaterial aufweist und für eukaryotische Mikroorganismen (20) oder für Blaualgen im wesentlichen undurchlässig ist,
 - die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder die Blaualgen auf die erste Hauptfläche (19) appliziert werden und dort ablösbar immobilisiert verbleiben,
 - entlang der zweiten Hauptfläche (22) eine wässrige Lösung (18) strömt,
 - ein Teil der strömenden wässrigen Lösung (18) im wesentlichen auf Grund von Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche (22) durch den Träger (14) hindurch bis an die erste Hauptfläche (19) tritt,
 - wodurch die erste Hauptfläche (18) mit wässriger Lösung (18) versorgt wird und
 - die applizierten eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder Blaualgen auf der ersten Hauptfläche (19) wachsen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei sich in dem von der wässrigen Lösung (18) gebildeten Film eine die wässrige Lösung (18) über die zweite Hauptfläche (22) des oder jedes perforierten Trägers (14,16) verteilende Verteilerschicht (23) befindet.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Verteilerschicht (23) ein Vlies aus insbesondere Glas- oder Kunststofffasern, und insbesondere ein Geotextil ist.

- 15 -

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der perforierte Träger (14), der weitere perforierte Träger (16) und/oder die Verteilerschicht (23), sofern vorhanden, hydrophil ist/sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der perforierte Träger (14), der weitere perforierte Träger (16) und/oder die Verteilerschicht (23), sofern vorhanden, mineralische Fasern, hydrophile organische Fasern, insbesondere organische oder anorganische Materialien, oder Kombinationen davon aufweist.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
 - dass ein weiterer Träger (10) mit einer ersten Hauptfläche (19) und einer zweiten Hauptfläche (22) bereitgestellt wird, wobei der weitere Träger (10) ebenfalls ein Bahnmaterial aufweist und für eukaryotische Mikroorganismen (20) oder Blaualgen im wesentlichen undurchlässig ist, und auf die erste Hauptfläche (19) des weiteren Trägers (10) die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder Blaualgen appliziert werden und dort ablösbar immobilisiert verbleiben,
 - dass beide Träger (10) mit ihren zweiten Hauptflächen (22) einander zugewandt und zueinander im wesentlichen parallel angeordnet werden und
 - dass die wässrige Lösung zwischen die zweite Hauptflächen (22) der beiden Träger (10) eingebracht wird und zwischen diesen Hauptflächen (22) unter Kontakt mit ihnen strömt.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei nach der Kultivierung die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder die Blaualgen vom perforierten Träger (14) und/oder vom weiteren perforierten Träger (16) durch Einwirkung mechanischer Kräfte wie Abschaben oder chemischer Behandlung wie Behandlung mit oberflächenaktiven Agenzien und/oder organischen Lösungsmitteln abgelöst werden, die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder die Blaualgen zusammen mit

dem perforierten Träger (14) geerntet werden, die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder die Blaualgen durch Auffangen abgelöster Biomasse in fließendem Kulturmedium geerntet werden und/oder wobei die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder die Blaualgen nach Trocknung vom porösen Träger (14) sich ablösen und danach aufgefangen werden.

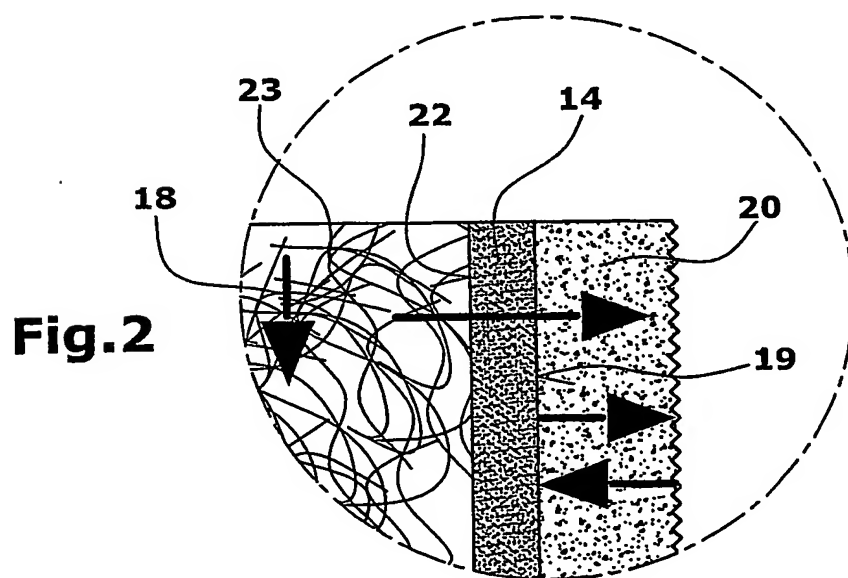
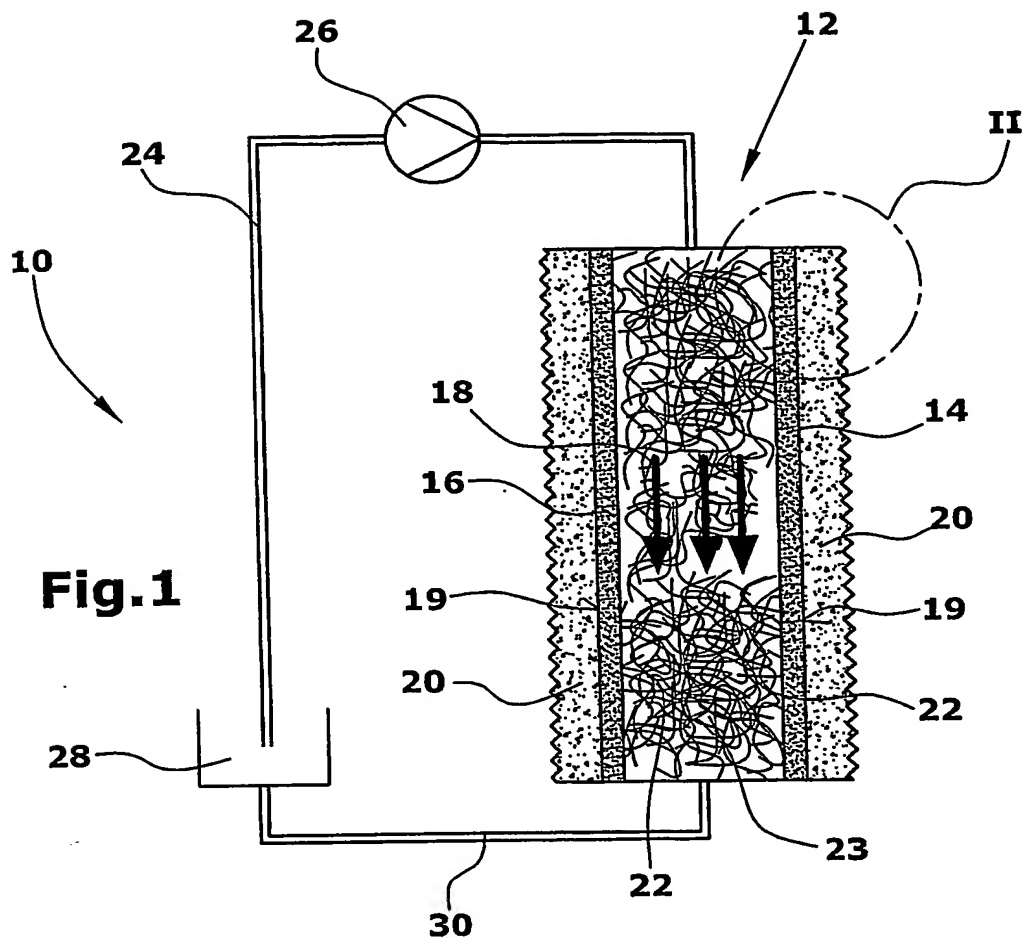
8. Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere Algen, Mikroalgen, oder von Blaualgen, mit
 - einem perforierten Träger (14), der eine erste Hauptfläche (19) und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche (22) aufweist,
 - wobei die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder Blaualgen auf der ersten Hauptfläche (19) des perforierten Trägers (14) kultivierbar sind und der perforierte Träger (14) für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder Blaualgen im wesentlichen undurchlässig ist, und
 - einem eine wässrige Lösung (18) aufweisenden Film, der in Kontakt mit lediglich der zweiten Hauptfläche (22) des Trägers (14) steht und entlang dieser strömt,
 - wobei die wässrige Lösung (18) auf Grund von Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche (22) durch den perforierten Träger (14) hindurch zur ersten Hauptfläche (19) transportierbar ist.
9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, gekennzeichnet durch einen weiteren perforierten Träger (16), der eine erste Hauptfläche (19) und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche (22) aufweist,
 - wobei eukaryotische Mikroorganismen (20) oder Blaualgen auf der ersten Hauptfläche des weiteren perforierten Trägers (16) kultivierbar sind und der weitere perforierte Träger (16) für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder Blaualgen im wesentlichen undurchlässig ist und

- 17 -

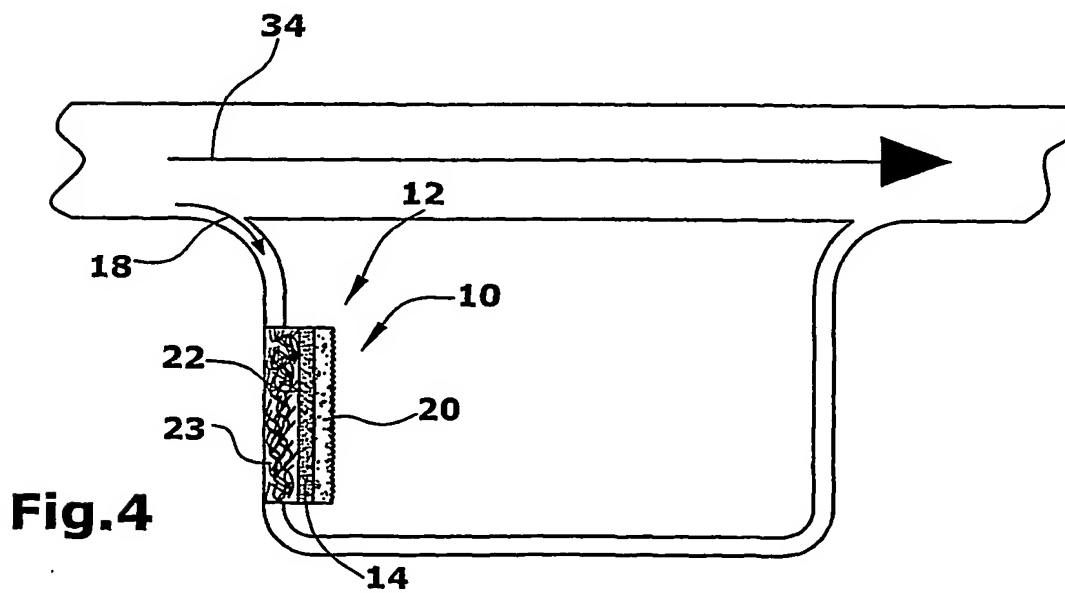
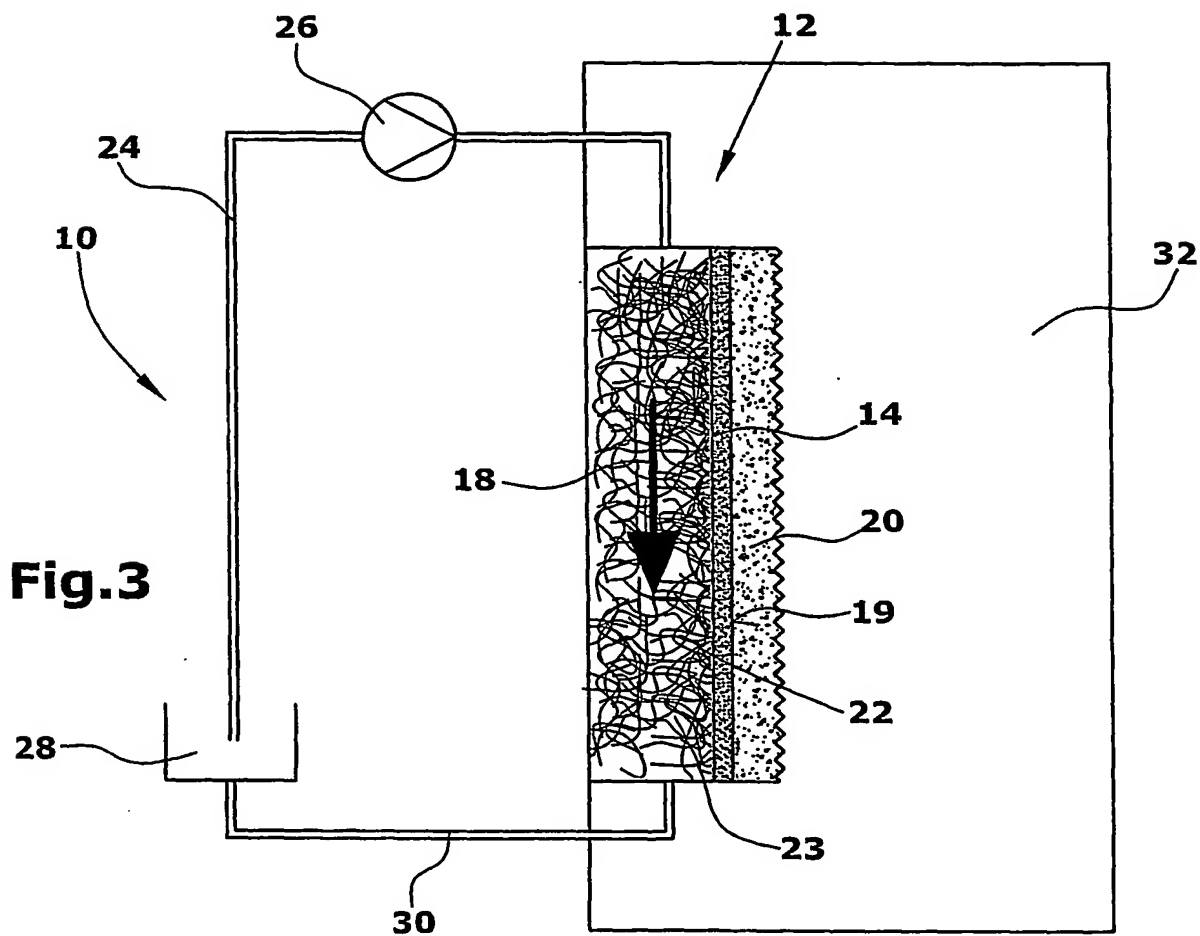
- wobei die zweiten Hauptflächen (22) beider Träger (14,16) einander zugewandt und durch den die wässrige Lösung (18) aufweisenden Film voneinander beabstandet sind.
10. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sich in dem von der wässrigen Lösung (18) gebildeten Film eine die wässrige Lösung (18) über die zweite Hauptfläche (22) des oder jedes perforierten Trägers (14,16) verteilende Verteilerschicht (23) befindet.
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilerschicht (23) ein Vlies aus insbesondere Glas- oder Kunststofffasern, und insbesondere ein Geotextil ist.
12. Biosensor mit eukaryotischen Mikroorganismen, Insbesondere Algen, Mikroalgen, oder mit Blaualgen, mit
- einem perforierten Träger (14), der eine erste Hauptfläche (19) und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche (22) aufweist,
 - wobei die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder die Blaualgen auf der ersten Hauptfläche (19) des perforierten Trägers (14) immobilisiert kultivierbar sind und der perforierte Träger (14) für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder die Blaualgen im wesentlichen undurchlässig ist, und
 - einem eine wässrige Lösung (18) aufweisenden Film, der in Kontakt mit lediglich der zweiten Hauptfläche (22) des Trägers (14) steht und über diese strömt,
 - wobei die wässrige Lösung (18) auf Grund von Kapillarkräften von der zweiten Hauptfläche (12) durch den perforierten Träger (14) hindurch zur ersten Hauptfläche (19) transportierbar ist,
 - wobei die Kultivierung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der wässrigen Lösung und/oder eines in Kontakt mit der ersten Hauptfläche (19) des perforierten Trägers (14) und/oder der eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder der Blaualgen stehenden Fluids erfolgt.

13. Biosensor nach Anspruch 12, gekennzeichnet durch einen weiteren perforierten Träger (16), der eine erste Hauptfläche (19) und eine dieser gegenüberliegende zweite Hauptfläche (22) aufweist,
- wobei eukaryotische Mikroorganismen (20) oder Blaualgen auf der ersten Hauptfläche (19) des weiteren perforierten Trägers (16) kultivierbar sind und der weitere perforierte Träger (16) für die zu kultivierenden eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder Blaualgen im wesentlichen undurchlässig ist und
 - wobei die zweiten Hauptflächen (22) beider Träger (14,16) einander zugewandt und durch den von der wässrigen Lösung (18) gebildeten Film voneinander beabstandet sind.
14. Biosensor nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass sich in dem die wässrige Lösung (18) aufweisenden Film eine die wässrige Lösung (18) über die zweite Hauptfläche (22) des oder jedes perforierten Trägers (14,16) verteilende Verteilerschicht (23) befindet.
15. Biosensor nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilerschicht (23) ein Vlies aus insbesondere Glas- oder Kunststofffasern, insbesondere ein Geotextil ist.
16. Biosensor nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung (18) eine Nährlösung für die eukaryotischen Mikroorganismen (20) oder die Blaualgen aufweist.
17. Biosensor nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der oder jeder perforierte Träger (14,16) und, falls vorhanden, die Verteilerschicht (23) hydrophil ist/sind.

- 1/2 -



- 2/2 -



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/008144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12M1/12 C12M3/06 C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12M C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 90/02170 A (SECRETARY TRADE IND BRIT) 8 March 1990 (1990-03-08)	1-6,8-17
Y	page 2, line 36 - page 3, line 4; claims; figures 1-3	2,7
X	US 2 761 813 A (ALEXANDER GOETZ) 4 September 1956 (1956-09-04)	8-17
Y	column 2, line 26 - column 3, line 36 column 6, line 60 - column 7, line 14; figures 1,2,7-10	2
Y	US 4 600 694 A (CLYDE ROBERT A) 15 July 1986 (1986-07-15) column 2, line 44 - column 3, line 29; figure 1	7
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 December 2004

Date of mailing of the international search report

30/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/008144

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DHANANJAY PATANKAR ET AL: "WALL-GROWTH HOLLOW-FIBER REACTOR FOR TISSUE CULTURE: OII. A THEORETICAL MODEL" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. INCLUDING: SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN ENERGY PRODUCTION AND CONSERVATION, JOHN WILEY & SONS. NEW YORK, US, vol. 36, no. 1, 5 June 1990 (1990-06-05), pages 104-108, XP000128553 ISSN: 0006-3592 the whole document</p> <p>-----</p>	1,8,12
X	<p>EP 0 112 155 A (BIO RESPONSE INC) 27 June 1984 (1984-06-27) claims; figures</p> <p>-----</p>	1,8,12
X	<p>US 6 013 511 A (DOYEN WILLY ET AL) 11 January 2000 (2000-01-11) abstract; figures 1,2,4</p> <p>-----</p>	1,8,12
X	<p>US 4 937 196 A (WRASIDLO WOLFGANG J ET AL) 26 June 1990 (1990-06-26) the whole document</p> <p>-----</p>	1,8,12
X	<p>DATABASE EPODOC EUROPEAN PATENT OFFICE, THE HAGUE, NL; 2 December 1999 (1999-12-02), GEORGIU CHRISTOS: "Special Apparatus for Cultivating Organisms in a liquid Nutrient Medium within a Petri Dish or Various Other Types of Dish" XP002283679 abstract</p> <p>-----</p>	8,12
X	<p>-& GR 1 003 266 B (GEORGIU CHRISTOS) 2 December 1999 (1999-12-02) figures</p> <p>-----</p>	1,5,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008144

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9002170	A	08-03-1990	WO 9002170 A1	08-03-1990
US 2761813	A	04-09-1956	NONE	
US 4600694	A	15-07-1986	NONE	
EP 0112155	A	27-06-1984	AU 2232683 A	21-06-1984
			EP 0112155 A2	27-06-1984
			JP 59175877 A	04-10-1984
			ZA 8309242 A	26-09-1984
US 6013511	A	11-01-2000	NONE	
US 4937196	A	26-06-1990	NONE	
GR 1003266	B	29-01-1999	GR 97100171 A	29-01-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008144

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12M1/12 C12M3/06 C12Q1/02

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12M C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 90/02170 A (SECRETARY TRADE IND BRIT) 8. März 1990 (1990-03-08)	1-6,8-17
Y	Seite 2, Zeile 36 - Seite 3, Zeile 4; Ansprüche; Abbildungen 1-3	2,7
X	US 2 761 813 A (ALEXANDER GOETZ) 4. September 1956 (1956-09-04)	8-17
Y	Spalte 2, Zeile 26 - Spalte 3, Zeile 36 Spalte 6, Zeile 60 - Spalte 7, Zeile 14; Abbildungen 1,2,7-10	2
Y	US 4 600 694 A (CLYDE ROBERT A) 15. Juli 1986 (1986-07-15) Spalte 2, Zeile 44 - Spalte 3, Zeile 29; Abbildung 1	7
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Dezember 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/12/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gruber, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
X	<p>DHANANJAY PATANKAR ET AL: "WALL-GROWTH HOLLOW-FIBER REACTOR FOR TISSUE CULTURE: ÖII. A THEORETICAL MODEL" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. INCLUDING: SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN ENERGY PRODUCTION AND CONSERVATION, JOHN WILEY & SONS. NEW YORK, US, Bd. 36, Nr. 1, 5. Juni 1990 (1990-06-05), Seiten 104-108, XP000128553 ISSN: 0006-3592 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1,8,12
X	<p>EP 0 112 155 A (BIO RESPONSE INC) 27. Juni 1984 (1984-06-27) Ansprüche; Abbildungen</p> <p>-----</p>	1,8,12
X	<p>US 6 013 511 A (DOYEN WILLY ET AL) 11. Januar 2000 (2000-01-11) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2,4</p> <p>-----</p>	1,8,12
X	<p>US 4 937 196 A (WRASIDLO WOLFGANG J ET AL) 26. Juni 1990 (1990-06-26) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1,8,12
X	<p>DATABASE EPODOC EUROPEAN PATENT OFFICE, THE HAGUE, NL; 2. Dezember 1999 (1999-12-02), GEORGIU CHRISTOS: "Special Apparatus for Cultivating Organisms in a liquid Nutrient Medium within a Petri Dish or Various Other Types of Dish" XP002283679 Zusammenfassung</p>	8,12
X	<p>-& GR 1 003 266 B (GEORGIU CHRISTOS) 2. Dezember 1999 (1999-12-02) Abbildungen</p> <p>-----</p>	1,5,10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008144

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9002170	A	08-03-1990	WO	9002170 A1	08-03-1990
US 2761813	A	04-09-1956	KEINE		
US 4600694	A	15-07-1986	KEINE		
EP 0112155	A	27-06-1984	AU	2232683 A	21-06-1984
			EP	0112155 A2	27-06-1984
			JP	59175877 A	04-10-1984
			ZA	8309242 A	26-09-1984
US 6013511	A	11-01-2000	KEINE		
US 4937196	A	26-06-1990	KEINE		
GR 1003266	B	29-01-1999	GR	97100171 A	29-01-1999